

5-fluorouracyl (5-FU) jest jednym z najskuteczniejszych chemioterapeutyków, używanych w leczeniu raka jelita grubego. Jest on również stosowany u chorych na raka piersi, głowy i szyi, przełyku, żołądka oraz w przypadku kilku innych nowotworów. Cytotoksyczne działanie 5-FU wymaga jego wewnątrzkomórkowej aktywacji. Aktywne metabolity 5-FU to przede wszystkim monofosforan 5-fluoro-2'-dezoksyuridy (5-FdUMP), trifosforan 5-fluoro-2'-dezoksyuridy (5-FdUTP) oraz trifosforan 5-fluorouridy (5-FUTP). W obecności kofaktora (5,10-metylenotetrahydrofolian) 5-FdUMP tworzy stabilny kompleks z syntetazą tymidylową (TS). Zablokowanie aktywności TS jest przyczyną niedoboru trifosforanu 2'-dezytymidyny, co zaburza syntezę i naprawę DNA. Włączenie 5-FdUTP do DNA jest dodatkową przyczyną cytotoksyczności. Ponadto 5-FUTP jest wbudowywany do wszystkich rodzajów RNA. Proces ten zaburza funkcje RNA i biosyntezę białek. Wspólne działanie metabolitów 5-FU powoduje zahamowanie syntezy DNA, zaburza jego stabilność i uszkadza nowo powstające cząsteczki. Stres genotoksyczny, który jest wynikiem działania 5-FU, prowadzi do apoptozy. Uszkodzenia DNA są wykrywane przez białka, takie jak ATM, ATR oraz kompleksy białkowe MRN i 9-1-1. Sygnały o uszkodzeniu DNA są przekazywane dalej za pośrednictwem kinaz CHK1 i CHK2 oraz fosfataz CDC25. Enzymy te aktywują mechanizmy apoptozy zależnej od p53, jak również inaktywują kinazy zależne od cyklin, co w konsekwencji powoduje zahamowanie cyklu komórkowego. Reaktywne formy tlenowe wytwarzane w mitochondriach odgrywają istotną rolę w apoptozie generowanej przez 5-FU.

**Słowa kluczowe:** 5-fluorouracyl, syntetaza tymidylowa, uszkodzenie DNA, p53, apoptoza, rak.

## Jak działa 5-fluorouracyl

### *How 5-fluorouracil acts*

**Marlena Wawrocka-Pawlak**

Katedra i Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, Akademia Medyczna w Warszawie

### Wstęp

5-fluorouracyl (5-FU) jest szeroko stosowanym lekiem przeciwnowotworowym z grupy antymetabolitów. Najczęściej wchodzi w skład programów wielolekowych lub jest używany jako element składowy chemioradioterapii. Nowotwory leczone z udziałem 5-FU to przede wszystkim raki różnych części przewodu pokarmowego – jelita grubego, odbytnicy, żołądka, przełyku [1–4], ponadto raki piersi [5], trzustki [6], oraz głowy i szyi [7–9]. 5-FU jest stosowany także w leczeniu raka nerki [10], prostaty i jajnika [11], jak również w systemowym leczeniu rakowiaków [12]. Miejscowe podawanie 5-FU odgrywa znaczącą rolę w leczeniu podstawnomórkowego raka skóry [13]. 5-FU jest też często podawany dotętniczo w przypadku leczenia guzów nowotworowych wątroby [14–16].

5-FU, który należy do analogów pirymidyn, jest w klasycznym ujęciu zaliczany do leków fazowo specyficznych. Oznacza to, że działanie tego leku jest ograniczone do pewnej części (fazy) cyklu komórkowego. 5-FU jest określany jako lek zależny od fazy S, a zatem jego działaniu podlegają komórki syntetyzujące kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA). Jednakże, w przeciwieństwie do innych antymetabolitów, 5-FU nie wykazuje fazy *plateau* w zakresie krzywej zależności odpowiedzi komórkowej od dawki [11]. Inaczej mówiąc, 5-FU posiada, przynajmniej częściowo, właściwość przypisywaną lekom fazowo niespecyficznym (np. lekom alkilującym) – zwiększenie dawki leku powoduje zwiększenie frakcji zabijanych komórek (zależność odpowiedzi komórkowej od dawki jest liniowa).

Przedstawiony powyżej paradoks (lek fazowo specyficzny zachowuje się jak lek fazowo niespecyficzny) wynika ze złożonego mechanizmu działania 5-FU. Kluczowy mechanizm blokowania syntezy DNA (hamowanie aktywności syntetazy tymidylowej) powoduje, że komórki wytwarzające DNA (czyli znajdujące się w fazie S cyklu komórkowego) są szczególnie wrażliwe na ten lek. Z drugiej strony inne mechanizmy, takie jak wbudowywanie metabolitów 5-FU do kwasu rybonukleinowego (RNA) i w konsekwencji hamowanie syntezy białek czy też produkcja dużej ilości reaktywnych form tlenowych, mogą być odpowiedzialne za obserwowaną liniową zależność odpowiedzi od dawki.

### Cel pracy

Celem niniejszej pracy jest:

- 1) omówienie działania 5-FU na poziomie metabolizmu kwasów nukleinowych,
- 2) przedstawienie mechanizmów odpowiedzialnych za wykrywanie uszkodzeń DNA indukowanych przez ten lek, jak również omówienie procesów odpowiedzialnych za indukowanie apoptozy w odpowiedzi na 5-FU.

### Wewnątrzkomórkowa aktywacja 5-FU

Procesy metaboliczne, którym 5-FU podlega po wnikięciu do komórki, są dobrze poznane (ryc. 1.). Pierwszym etapem metabolizmu 5-FU jest jego przekształcenie w 5-fluoro-2'-dezyuridynę (5-FUdR), które jest katalizowane

5-fluorouracil (5-FU) has proved to be one of the most effective chemotherapeutics for colorectal cancer. It is also used as a drug against breast, head and neck, esophageal, gastric, and several other cancers. Intracellular activation is required for the 5-FU to exert its cytotoxic effects. The main active 5-FU metabolites are 5-fluoro-2'-deoxyuridine monophosphate (5-FdUMP), 5-fluoro-2'-deoxyuridine triphosphate (5-FdUTP), and 5-fluorouridine triphosphate (5-FUTP). In the presence of the reduced folate cofactor, 5,10-methylenetetrahydrofolate, 5-FdUMP forms a stable covalent complex with thymidylate synthase (TS). Inhibition of TS leads to depletion of 2'-deoxythymidine triphosphate, thus interfering with DNA biosynthesis and repair. Incorporation of 5-FdUTP into cellular DNA, with resultant inhibition of DNA synthesis and function, may represent another mechanism of cytotoxicity. In addition, 5-FUTP is extensively incorporated into both nuclear and cytoplasmic RNA species, and this process interferes with normal RNA function and protein synthesis. The combined actions of 5-FU metabolites are associated with inhibition of DNA biosynthesis, altered DNA stability, production of DNA damages, and interference with DNA repair. The genotoxic stress resulting from 5-FU administration may activate apoptosis in susceptible cells. The DNA damage checkpoints employ damage sensor proteins, such as ATM, ATR, the MRN complex, and the 9-1-1 complex, to detect DNA damage and to initiate signal transduction cascades that employ Chk1 and Chk2 kinases and Cdc25 phosphatases. The signal transducers activate p53-dependent apoptosis, as well as inactivate cyclin-dependent kinases to inhibit cell cycle progression. Several studies have implicated mitochondria-derived reactive oxygen species in 5-FU-dependent apoptosis.

**Key words:** 5-fluorouracil, thymidylate synthase, DNA damage, p53, apoptosis, cancer.

przez enzym fosforylaze tyminydy. Następnie, przy udziale kinazy tyminydy, 5-FUDR podlega fosforylacji. W rezultacie powstaje monofosforan 5-fluoro-2'-deoksyurydyny (5-FdUMP), który jest aktywnym metabolitem 5-FU [17].

Jednocześnie 5-FU podlega metabolizmowi w dwóch innych szlakach biochemicznych. Pierwszym z nich jest przekształcanie 5-FU do 5-FdUMP poprzez powstawanie kolejno: 5-fluorourydyny (5-FUR) – przy udziale fosforylasy urydynowej, monofosforanu 5-fluorourydyny (5-FUMP) – reakcja katalizowana przez kinazę urydynową, oraz dwufosforanu 5-fluorourydyny (5-FUDP). Ten ostatni związek jest bezpośrednim źródłem 5-FdUMP. Drugim dodatkowym szlakiem metabolicznym jest bezpośrednia synteza 5-FUMP z 5-FU katalizowana przez fosforybozylotransferazę orotanową. 5-FUMP jest źródłem nie tylko 5-FUDP (i w konsekwencji – 5-FdUMP), ale stanowi również substrat do produkcji trifosforanu 5-fluorourydyny (5-FUTP). Również 5-FdUMP może być metabolizowany do trifosforanu 5-fluoro-2'-deoksyurydyny (5-FdUTP). Zarówno 5-FUTP, jak i 5-FdUTP są, obok 5-FdUMP, aktywnymi metabolitami 5-FU, które oddziałują z biochemicznymi punktami uchwytu dla działania tego leku w komórce [18].

### Biochemiczne punkty uchwytu dla działania 5-FU

5-FdUMP jest kluczowym mediatorem hamowania syntezy DNA w komórkach poddanych działaniu 5-FU. Punktem uchwytu dla działania tego związku jest enzym syntetaza tymidylowa (ang. *thymidylate synthase* – TS). TS jest jedynym enzymem zdolnym do katalizowania reakcji syntezy 5'-monofosforanu-2'-deoksytymidyny (dTMP) z 5'-monofosforanu-2'-deoksyurydyny (dUMP) [19]. W obecności 5,10-tetrahydrofolianu 5-FdUMP tworzy wolno dysocjujący kompleks z TS. Powstanie tego kompleksu uniemożliwia oddziaływanie TS z jej naturalnym substratem, jakim jest dUMP [20].

Fosforylacja dTMP prowadzi do powstania trifosforanu 2'-deoksytymidyny (dTTP), który jest bezpośrednio wbudowywany do nowo powstających cząsteczek DNA. A zatem komórki pozbawione aktywności TS nie są zdolne do kontynuowania syntezy DNA z powodu niedoboru jednego z podstawowych substratów – następuje zatrzymanie widełek replikacyjnych i dokończenie powielania informacji genetycznej zakodowanej w DNA jest niemożliwe [21]. W konsekwencji cykl komórkowy zatrzymuje się w fazie S, ponieważ warunkiem kontynuacji procesów biochemicznych prowadzących do podziału komórki jest pełna replikacja DNA umożliwiająca przekazanie informacji genetycznej do komórek potomnych. Jednakże, jak zobaczymy w dalszej części opisu, zablokowanie syntezy DNA z powodu zahamowania aktywności TS nie jest bezwzględne.

Jak wspomniano powyżej, 5-FdUMP może być metabolizowany do 5-FdUTP, który to trifosforan może *zastąpić* dTTP jako substrat do syntezy DNA [22]. Jednakże w prawidłowym DNA urydyna nie występuje. Jej obecność w nowo syntetyzowanych cząsteczkach DNA jest odbierana przez komórkę jako nieprawidłowość wymagająca biochemicznej naprawy. Enzymem odpowiedzialnym za usuwanie niepożądanego zasady azotowej jest w tym przypadku glikozylaza uracylowa. Cena za usunięcie uracylu z DNA jest jednak bardzo wysoka – powstają tak zwane miejsca apirymidynowe (brak zasady azotowej w łańcuchach DNA), a w przypadku, gdy kilka cząsteczek urydyny występuje obok siebie, syntetyzowany DNA traci integralność ulegając fragmentacji [23].

Obok DNA również RNA jest celem działania 5-FU [24, 25]. Działanie to dotyczy wszystkich rodzajów RNA – zarówno występujących w cytoplazmie (informacyjny RNA – mRNA, transportujący RNA – tRNA, rybosomalny RNA – rRNA), jak i tych, które są obecne w jądrze komórkowym (jądrowy RNA – nRNA, mały jądrowy RNA – snRNA) [26–32]. W tym przypadku związkiem wbudowywanym do nowo powstających cząsteczek RNA jest 5-FUTP. Na poziomie molekularnym efekty syntezy RNA z udziałem 5-FUTP są opisywane jako: 1) zmiana struktury drugorzędowej cząsteczek RNA, co dramatycznie zaburza syntezę białek,

- 2) hamowanie poliadenylacji mRNA, która jest procesem zwiększającym stabilność nowo syntetyzowanych cząsteczek i chroniącym je przed przedwczesną degradacją,
- 3) hamowanie powstawania rRNA z cząsteczek nRNA, co powoduje wytwarzanie nieprawidłowych rybosomów i w konsekwencji uniemożliwia komórce normalną syntezę białek,
- 4) zmiany struktury snRNA, które powodują zaburzenia procesu wycinania intronów z mRNA i składania transkryptów.

Wszystkie zmiany w budowie RNA opisane powyżej są – obok zaburzeń syntezy DNA – odpowiedzialne za cytotoksyczne działanie 5-FU.

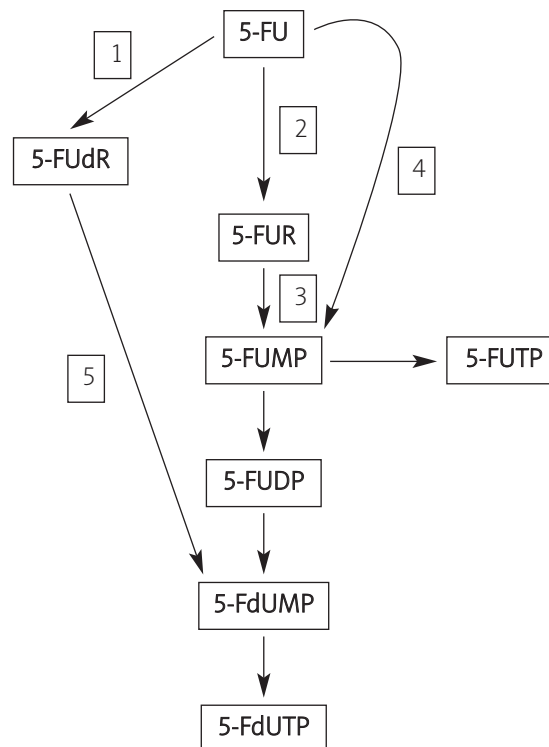
### Uszkodzenie dna jako przyczyna cytotoksyczności 5-FU

Uszkodzenie DNA (ang. *DNA damage*) może być zdefiniowane jako każda zmiana w budowie chemicznej DNA [33]. Uszkodzenia DNA można podzielić na uszkodzenia zasad azotowych oraz utratę integralności łańcucha DNA. Drugi z wymienionych przypadków występuje w sytuacji przerwania syntezy DNA (np. zatrzymanie widetek replikacyjnych jako skutek zahamowania aktywności TS i niedoboru dTTP) lub rozbicia wiązań fosfodiestrowych, utrzymujących pierwszorzędową strukturę DNA. Uszkodzenie zasad azotowych może przybierać dwie postacie [34, 35]:

- 1) jakiegokolwiek zmiany chemicznej w budowie adeniny, guaniny, cytozyny lub tyminy;
- 2) obecności nieprawidłowych zasad w łańcuchu DNA (np. uracylu w przypadku komórek poddanych działaniu 5-FU).

Cząsteczki DNA mogą być uszkodzane w wyniku działania czynników endogennych i egzogennych. 5-FU należy oczywiście do drugiej z wymienionych grup. Niezależnie od danego czynnika wywołującego uszkodzenie DNA biologiczne reakcje komórek na zajście tego wydarzenia są podobne. Wyróżnia się 5 zasadniczych typów odpowiedzi komórkowej na uszkodzenie DNA [34, 36, 37]:

- 1) aktywacja punktów kontrolnych cyklu komórkowego, co prowadzi do zatrzymania tego cyklu i umożliwia komórce dokonanie naprawy uszkodzeń;
- 2) skoordynowana aktywacja transkrypcji dużej liczby genów, których produkty mają wpływ na przeżycie komórki;
- 3) uruchomienie mechanizmów apoptozy, które następuje w przypadku niemożności naprawienia uszkodzeń;
- 4) aktywacja szlaków biochemicznych pozwalających na kontynuowanie cyklu komórkowego pomimo obecności uszkodzonego DNA, co prowadzi do powstania mutacji w komórkach potomnych;
- 5) uruchomienie mechanizmów naprawy DNA.



**Ryc. 1.** Wewnątrzkomórkowy metabolizm 5-fluorouracylu. 5-FU – 5-fluorouracyl. 5-FdR – 5-fluoro-2'-dezoksyurydyna. 5-FUR – 5-fluorouracyldina. 5-FUMP – monofosforan 5-fluorouracyldiny. 5-FUDP – dwufosforan 5-fluorouracyldiny. 5-FUTP – trifosforan 5-fluorouracyldiny. 5-FdUMP – monofosforan 5-fluoro-2'-dezoksyurydyny. 5-FdUTP – trifosforan 5-fluoro-2'-dezoksyurydyny. 1 – fosforylaza tymidynowa. 2 – fosforylaza urydynowa. 3 – kinaza urydynowa. 4 – fosforybozylotransferaza orotanowa. 5 – kinaza tymidynowa

**Fig. 1.** Intracellular metabolism of 5-fluorouracil. 5-FU – 5-fluorouracil. 5-FdR – 5-fluoro-2'-deoxyuridine. 5-FUR – 5-fluorouridine. 5-FUMP – 5-fluorouridine monophosphate. 5-FUDP – 5-fluorouridine diphosphate. 5-FUTP – 5-fluorouridine triphosphate. 5-FdUMP – 5-fluoro-2'-deoxyuridine monophosphate. 5-FdUTP – 5-fluoro-2'-deoxyuridine triphosphate. 1 – thymidine phosphorylase. 2 – uridine phosphorylase. 3 – uridine kinase. 4 – orotate phosphoribosyltransferase. 5 – thymidine kinase

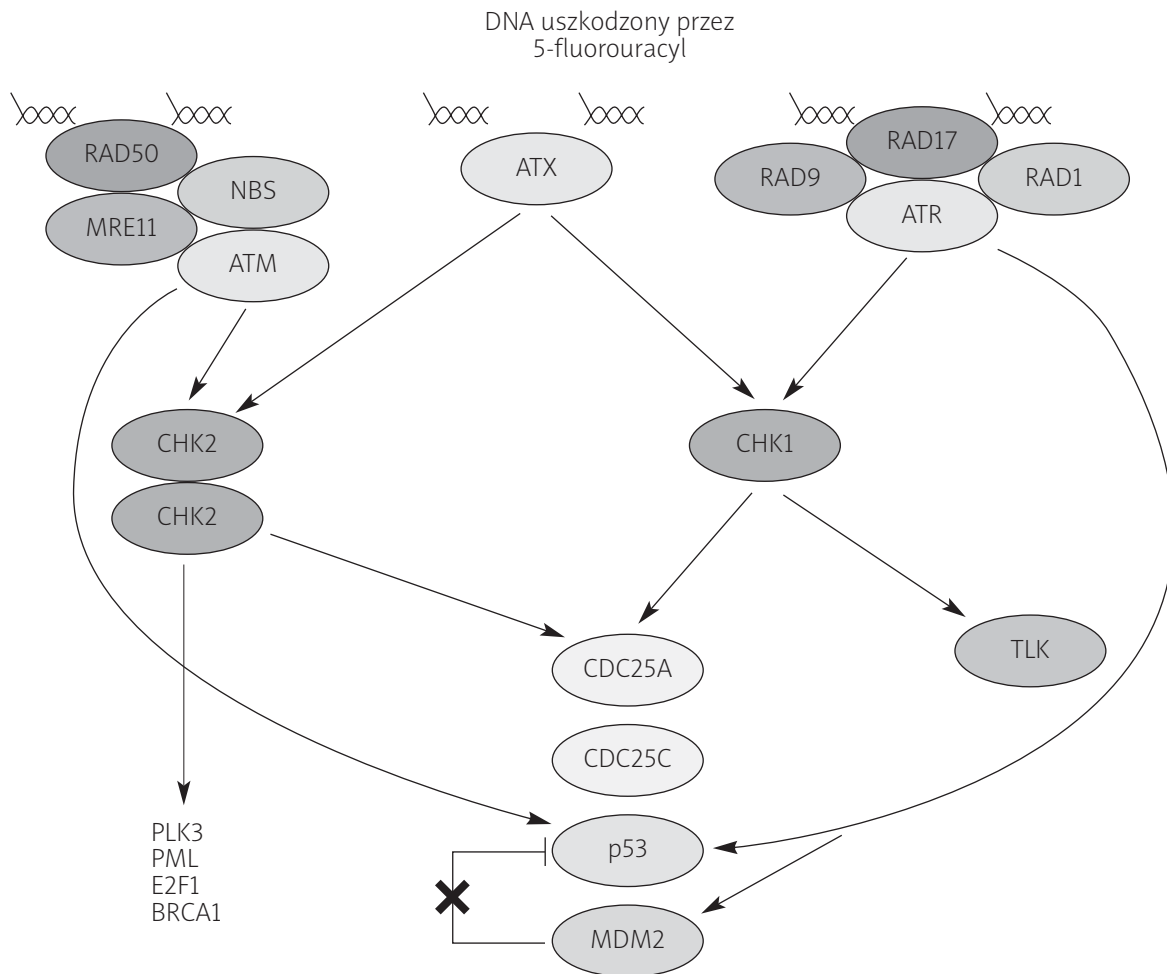
Dla wystąpienia cytotoksycznego działania 5-FU krytyczna jest indukcja apoptozy w odpowiedzi na uszkodzenie DNA, o czym w dalszej części artykułu.

Mechanizmy, odpowiedzialne za rozpoznawanie przez komórki obecności uszkodzonego DNA, są dalekie od pełnego zrozumienia. Kluczowymi sensorami uszkodzenia DNA wydają się być białka, które posiadają aktywność kinazową i wchodzi w skład rodziny ATM. Prototypowym białkiem tej rodziny jest ATM (ang. *ataxia teleangiectasia, mutated*). Nazwa pochodzi od zespołu chorobowego, którego przyczyną jest mutacja genu *ATM*, i który charakteryzuje się postępującą neurodegeneracją oraz obecnością teleangiektazji w obrębie gałek ocznych i skóry twarzy. Ponadto u chorych cierpiących z powodu tego zespołu występuje bezpłodność, niezdolność do rozwoju nowotworów złośliwych, która jest wielokrotnie większa w porównaniu z osobami posiadającymi prawidłowe kopie *ATM*. Biochemicznym podłożem zespołu ataksja-teleangiektazja jest niemożność naprawy dwuniciowych pęknięć DNA, co jest prostą konsekwencją inaktywacji ATM [38, 39]. Inne białka z rodziny ATM to ATR (ang. *ATM-related protein*) oraz ATX [40, 41].

ATM występuje w jądrze komórkowym jako nieaktywny dimer. W obecności dwuniciowych pęknięć DNA indukowanych przez 5-FU białko to podlega autofosforylacji, która powoduje dysocjację dimeru i uwolnienie aktywnych monomerów [42]. Przy udziale kompleksu białek zwanego MRN (od nazw poszczególnych składników – MRE11, RAD50 i NBS1) ATM jest zdolne do fosforylacji poszczególnych substratów [43].

Podobnie ATR wymaga do swojej aktywacji obecności odpowiedniego kompleksu białkowego związanego z pękniętym DNA. W tym przypadku chodzi o kompleks 9-1-1, który jest heterotrimerem zawierającym białka RAD9, RAD1 i HUS1 [44]. Kompleks ten łączy się z białkiem Rad17, które jest bezpośrednio związane z przerwaną nicią DNA, i aktywuje ATR [45, 46]. Najmniej wiadomo o sposobie działania ATX jako sensora uszkodzeń DNA, jednakże białko to fosforyluje te same substraty, co ATM i ATR [41].

Kluczowe znaczenie dla zrozumienia wpływu leków cytotoksycznych, takich jak 5-FU na biologię komórki miało poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za przenoszenie sygnału o obecności uszkodzonego DNA na białka bezpośrednio regulujące przebieg cyklu komórkowego i ewentualnie indukujące proces apoptozy. Droga od rozpoznania uszkodzenia do białek efektorowych wiedzie poprzez akty-



**Ryc. 2.** Wykrywanie uszkodzeń DNA indukowanych przez 5-fluorouracyl (szczegóły w tekście)  
**Fig. 2.** Detection of 5-fluorouracil-induced DNA damage (details – see the text)



wację odpowiednich kinaz i fosfataz. Ponadto ATM i ATR mogą bezpośrednio fosforylować białka, mające podstawowe znaczenie dla kontroli przeżycia komórki. W uproszczeniu opisywane procesy przebiegają w komórkach poddanych działaniu 5-FU następująco (ryc. 2.):

- 1) w wyniku zahamowania aktywności TK oraz usuwania wbudowanego uracylu tworzą się dwuniciowe pęknięcia DNA;
- 2) białka ATR, ATM oraz ATX łączą się z uszkodzonym DNA;
- 3) ATR fosforyluje kinazę CHK1, natomiast ATM – kinazę CHK2 [47, 48];
- 4) ATX posiada prawdopodobnie zdolność fosforylowania zarówno CHK1, jak i CHK2 [41];
- 5) cząsteczki CHK2 tworzą homodimery, których elementy składowe podlegają dalszej autofosforylacji [49];
- 6) aktywowane kinazy CHK1 i CHK2 fosforylują poszczególne białka, które ze względu na specyficzność substratu można podzielić na:
  - a) fosforylowane wyłącznie przez CHK1,
  - b) fosforylowane wyłącznie przez CHK2,
  - c) fosforylowane przez obie wymienione kinazy.

Do pierwszej grupy zalicza się kinazy TLK, zaangażowane w proces remodelingu chromatyny [50]. Druga grupa jest liczniejsza i obejmuje kinazę PLK3, białko PML, czynnik transkrypcyjny E2F1 oraz białko BRCA1 [41, 51–53]. Wreszcie do trzeciej z wymienionych grup należą fosfatazy CDC25A i CDC25C, oraz białka p53 i MDM2 [41, 54–56]; 7) zarówno ATM, jak i ATR mogą bezpośrednio fosforylować p53 [41, 57].

Wymienione powyżej mechanizmy pozwalają na uruchomienie procesów bezpośrednio odpowiedzialnych za zmiany biologiczne zachodzące w komórkach poddanych działaniu 5-FU.

## Egzekwowanie cytotoksyczności 5-FU

### Zahamowanie cyklu komórkowego

Główna reguła przestrzegana przez komórkę podczas przebiegu cyklu komórkowego zakłada, że przejście do kolejnego etapu może być dokonane jedynie wtedy, gdy poprzednia faza zakończyła się pomyślnie, tzn. bez błędów i uszkodzeń. Tak zwane punkty kontrolne cyklu komórkowego (ang. *cell-cycle checkpoints*) zapewniają wysoce efektywną kontrolę przebiegu poszczególnych faz tego procesu [58]. Opisane powyżej białka ATM, ATR i ATX są kluczowymi elementami punktu kontrolnego fazy S. Jeżeli syntetyzowany DNA zawiera uszkodzenia, to fakt ten jest wykrywany w tym punkcie kontrolnym i cykl komórkowy zostaje zatrzymany [59].

Cykl komórkowy podlega bardzo precyzyjnej regulacji. Jego przebieg jest uzależniony od przesunięć równowagi pomiędzy stymulatorami i inhibitorami. Motorem cyklu komórkowego są białka zwane cyklinami, które w ściśle określonym porządku czasowym fosforylują kinazy zależne od cyklin (ang. *cyclin dependent kinase* – CDK). Kinazy te powodują uruchomienie szlaków przekazywania sygnałów prowadzących do syntezy białek niezbędnych w danej fazie cyklu komórkowego. Z kolei inhibitory cyklu komórkowego to przede wszystkim białka odpowiedzialne za hamowanie aktywności CDK (inhibitory CDK, takie jak rodziny

białek CIP/KIP i INK4), białko RB odpowiedzialne za sekwestrację kluczowych czynników transkrypcyjnych z rodziny E2F oraz *strażnik genomu* – białko p53 [60].

W przypadku uszkodzenia DNA indukowanego przez 5-FU uruchomione zostają wyżej wymienione inhibitory (ryc. 3). Fosforylacja p53 powoduje:

- 1) aktywację tego białka jako czynnika transkrypcyjnego,
- 2) zmniejszenie jego powinowactwa do inhibitora MDM2.

Jako czynnik transkrypcyjny p53 stymuluje ekspresję genu kodującego białko p21 [61]. Z kolei p21 hamuje aktywność kompleksu cykliny A-CDK2, który jest niezbędny w fazie S cyklu komórkowego. Ponadto p21 aktywuje inne inhibitory, takie jak p27 oraz białka rodziny INK4. Białka INK4 są nie tylko inhibitorami kompleksu cykliny D-CDK4/6 (odpowiedzialny za fosforylację białka Rb i uwolnienie czynników transkrypcyjnych E2F), ale również hamują aktywność MDM2, który jest kluczowym inhibitorem p53 [60]. MDM2 jest kluczowym inhibitorem p53. Blokowanie wiązania MDM2, które jest wynikiem bezpośredniej fosforylacji p53 przez ATM i ATR, dodatkowo wzmacnia aktywność p53 jako czynnika transkrypcyjnego [62]. Wszystkie przedstawione mechanizmy prowadzą do przesunięcia równowagi w kierunku hamowania cyklu komórkowego w odpowiedzi na 5-FU.

Równoległe z działaniem opisanych powyżej inhibitorów istotną rolę w hamowaniu cyklu komórkowego w odpowiedzi na uszkodzenie DNA indukowane przez 5-FU odgrywają kinazy i fosfatazy fosforylowane przez CHK1 i CHK2. Intrygująca, choć nie w pełni wyjaśniona, jest rola kinazy PLK3. Wykazano, że zwiększona ekspresja tego białka chroni komórkę przed transformacją nowotworową [63]. Za supresorowe działanie PLK3 prawdopodobnie odpowiada hamujący wpływ tej kinazy na cykl komórkowy. Za pośrednictwem szlaku ATM/ATX – CHK2 aktywność PLK3 zwiększa się w odpowiedzi na obecność uszkodzonego DNA [41].

Fosfatazy CDC25A i CDC25C (obie są fosforylowane zarówno przez CHK1, jak i CHK2) również uczestniczą w hamowaniu cyklu komórkowego w odpowiedzi na uszkodzenie DNA indukowane przez 5-FU. W tym przypadku CHK1 i CHK2 inaktywują omawiane fosfatazy. CDC25A powoduje defosforylację tyrozyny w pozycji 15 w cząsteczce cyklicznej kinazy CDK2, co uaktywnia tę kinazę [54]. W przypadku zahamowania aktywności CDC25A następuje kumulacja nieaktywnej formy CDK2 i cykl komórkowy zostaje zatrzymany. Podobną rolę w stosunku do kinazy CDK1 odgrywa fosfataza CDC25C. W przypadku jej inaktywacji dochodzi do gromadzenia się nieaktywnej formy CDK1, co dodatkowo hamuje cykl komórkowy w fazie G2 [21, 55].

Opisane powyżej mechanizmy hamowania cyklu komórkowego w odpowiedzi na uszkodzenie DNA indukowane przez 5-FU chronią komórkę przed powielaniem błędów w czasie replikacji materiału genetycznego. Jednakże samo zatrzymanie cyklu nie wystarczy – konieczne są dalsze działania. W tym momencie komórka ma do wyboru dwie drogi: 1) naprawę uszkodzeń i powrót do przerwanego cyklu komórkowego, 2) uruchomienie mechanizmów apoptozy w przypadku, gdy naprawa uszkodzeń nie jest możliwa.

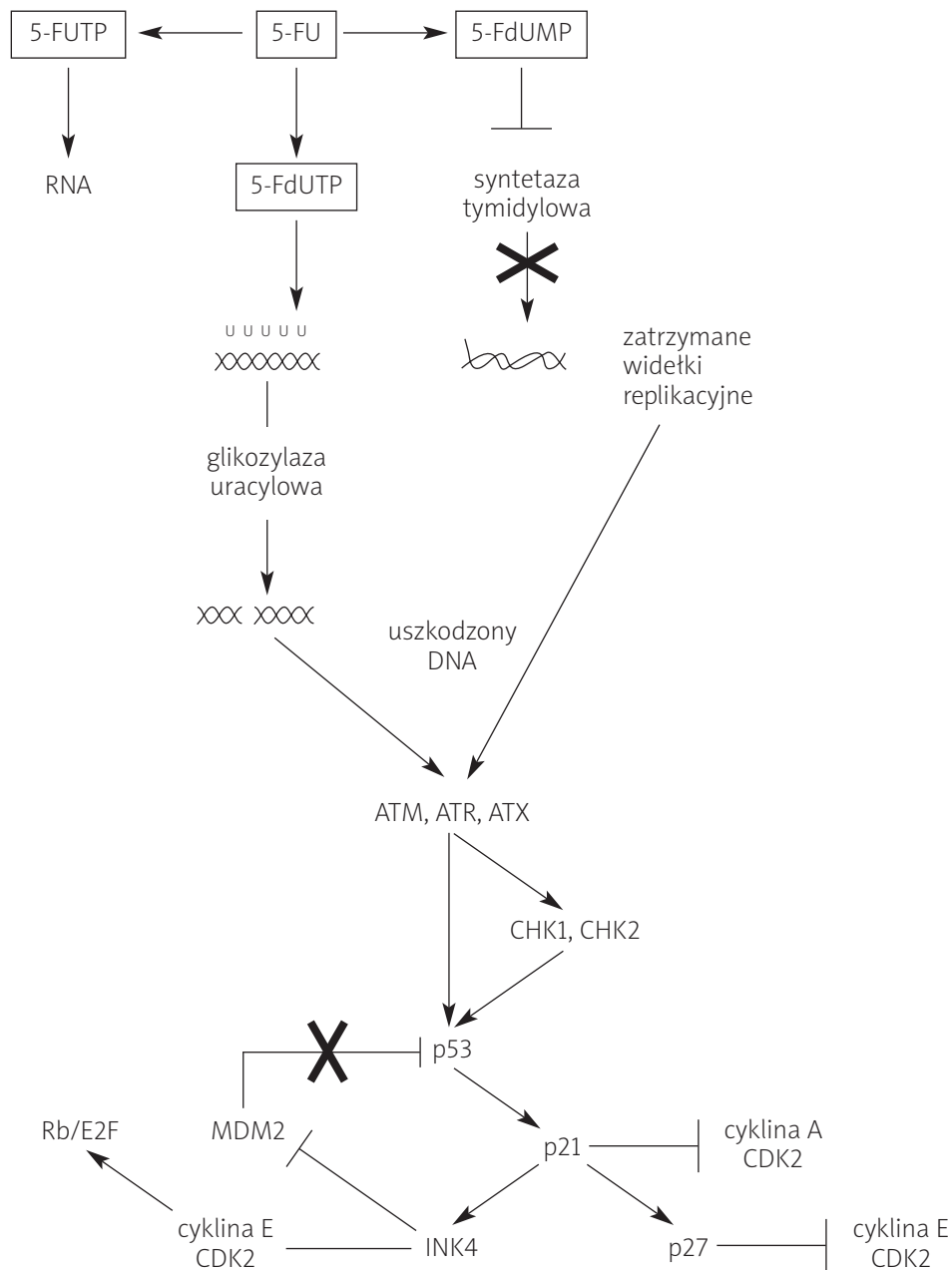
W przypadku komórek nowotworowych poddanych działaniu 5-FU cytotoksyczne działanie tego leku zależy od wyboru drugiej z wymienionych możliwości.

**Apoptoza**

Apoptozę definiuje się jako ściśle kontrolowany – w przeciwieństwie do nekrozy – proces prowadzący do śmierci komórki. Ponieważ mechanizmy odpowiedzialne za regulację tego procesu są zapisane w komórkowym materiale genetycznym, apoptoza bywa również określana jako programowana śmierć komórki. Komórki ssaków dysponują dwoma

głównymi szlakami molekularnymi, służącymi do inicjacji apoptozy: wewnątrzkomórkowym (wewnętrznym) i zewnątrzkomórkowym (zewnętrznym).

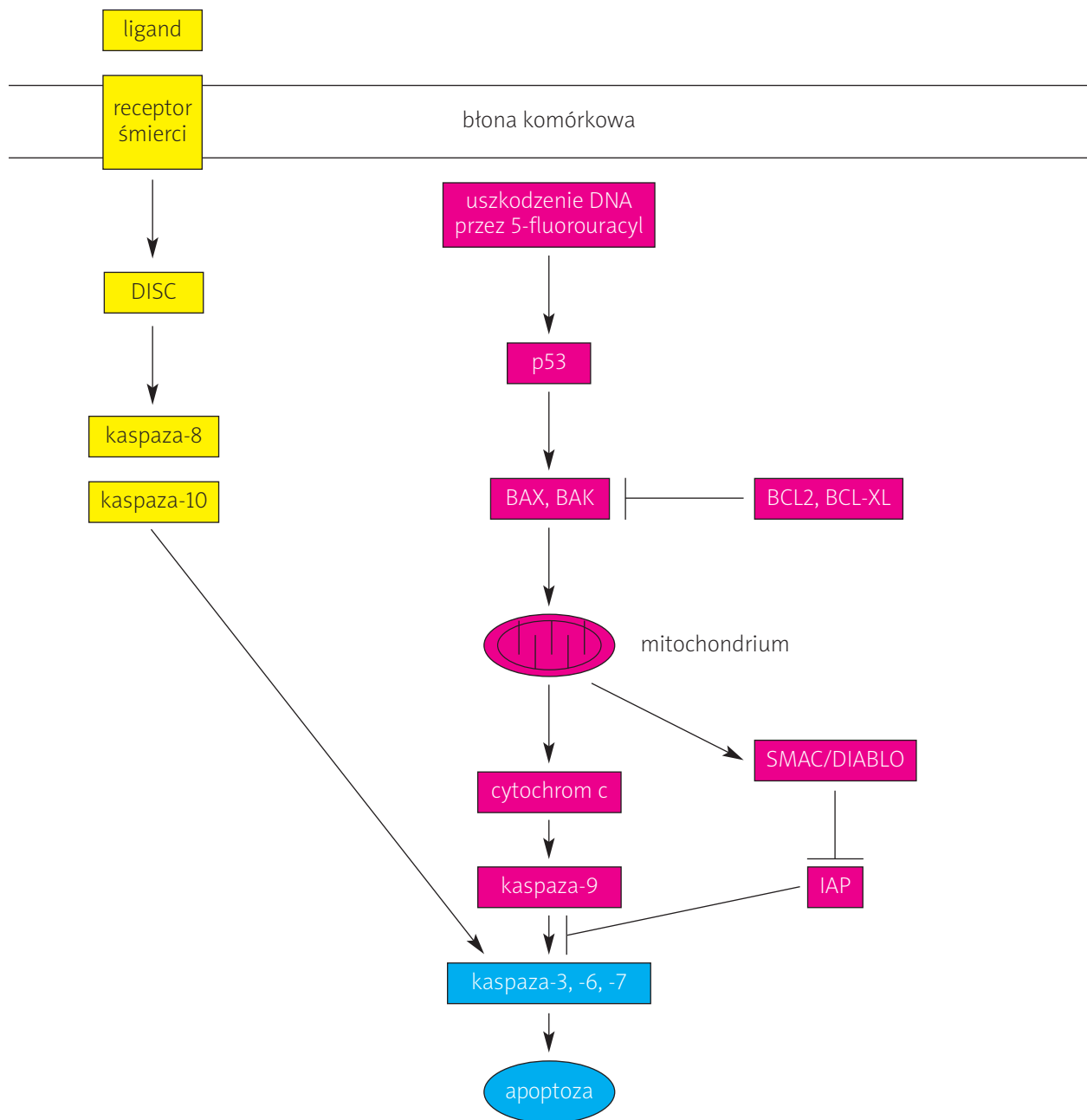
Szlak wewnętrzny uruchamia apoptozę w odpowiedzi na takie czynniki, jak uszkodzenie DNA, zaburzenia cyklu komórkowego, utrata kontaktu z macierzą zewnątrzkomórkową, hipoksja oraz niedobór substancji odżywczych [64, 65]. 5-FU, który indukuje uszkodzenia DNA, uruchamia apoptozę za pośrednictwem tego właśnie szlaku. Jak wykazano powyżej, obecność uszkodzeń DNA indukowanych przez 5-FU prowadzi do aktywacji białka p53. Białko to, działając jako czynnik transkrypcyjny, pobudza ekspresję genów kodujących białka



**Ryc. 3.** Mechanizmy hamowania cyklu komórkowego w odpowiedzi na uszkodzenie DNA przez 5-fluorouracyl (szczegóły – patrz tekst i ryc. 1). U – 5-fluorouracyl wbudowany do DNA  
**Fig. 3.** Mechanisms of cell cycle inhibition in response to 5-fluorouracil – related DNA damage (details – see the text and fig. 1). U – 5-fluorouracil incorporated into DNA

bezpośrednio zaangażowane w uwalnianie czynników inicjujących fazę efektorową apoptozy (ryc. 4.). Przede wszystkim chodzi tu o ekspresję białek proapoptotycznych z nadrodziny BCL2, głównie BAX i BAK [66]. Jeżeli białka te uzyskują przewagę nad należącymi do tej samej nadrodziny białkami antyapoptotycznymi (głównymi reprezentantami są tu BCL2 i BCL-XL), to z mitochondriów do cytoplazmy uwalniany jest cytochrom c oraz SMAC/DIABLO [67]. Cytochrom c aktywuje kaspazę-9, która z kolei aktywuje kaspazy-3, -6 i -7. Są to proteazy bezpośrednio degradujące struktury wewnątrzkomórkowe. SMAC/DIABLO wiąże się z IAP (ang. *inhibitor of apoptosis*) i zapobiega hamowaniu aktywności kaspaz [65, 68, 69].

Szlak zewnętrzny apoptozy bierze początek od przyłączenia się odpowiednich ligandów do tzw. receptorów śmierci, obecnych na powierzchni błony komórkowej. Głównymi reprezentantami są tu FAS/APO1, RANK, DR3, DR4, DR5, jak również receptory dla czynnika martwicy nowotworów (ang. *tumour-necrosis factor* – TNF). W tym przypadku kaspazy są aktywowane bez pośrednictwa p53 i bez udziału czynników uwolnionych z mitochondriów. Przyłączenie ligandu do receptora śmierci powoduje powstanie kompleksu DISC (ang. *death-inducing signalling complex*), który aktywuje kaspazę-8 i -10, które z kolei aktywują kaspazy efektorowe -3, -6 i -7 [65].



**Ryc. 4.** Główne szlaki przekazywania sygnałów inicjujących apoptozę (szczegóły w tekście). Kolor żółty – szlak zewnątrzkomórkowy. Kolor różowy – szlak wewnątrzkomórkowy indukowany przez 5-fluorouracyl

**Fig. 4.** Main signalling pathways initiating apoptosis (details – see the text). Yellow – cell-extrinsic pathway. Pink – cell-intrinsic pathway induced by 5-FU

Powszechnie przyjmuje się, że cytotoksyczna aktywność 5-FU zależy od obecności funkcjonalnego białka p53. Zostało to potwierdzone doświadczalnie, jak również dowiedzione w obserwacjach klinicznych. Na przykład badania przeprowadzone z użyciem linii komórkowych ludzkiego raka okrężnicy dowiodły, że inaktywacja p53 uodparnia komórki na działanie 5-FU [70,71]. Podobne wyniki uzyskano podczas badania linii komórkowych ludzkiego raka żołądka [72] i raka gardła [73]. Obecność mutacji w genie *TP53* kodującym białko p53 jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym i/lub predykcyjnym – w kontekście stosowania 5-FU – w przypadku raka odbytnicy [74], zaawansowanego raka żołądka [75], raka kanału odbytu [76], płaskonabłonkowego raka głowy i szyi [77], płaskonabłonkowego raka przełyku [78], przerzutów raka okrężnicy do wątroby [79], raka okrężnicy w II i III stopniu zaawansowania klinicznego [80] oraz raka piersi [81].

Wyniki kilku badań wskazują na ciekawą możliwość uwrażliwiania komórek poddanych działaniu 5-FU na apoptozę, sterowaną za pośrednictwem szlaku zewnętrznego. Badanie hodowli komórek ludzkiego raka wątrobowokomórkowego wykazało, że 5-FU wywołuje apoptozę niezależnie od wyjściowej ekspresji receptora FAS/APO1 [82]. Kolejne doniesienie wskazywało na istotny udział FAS/APO1-zależnej apoptozy w cytotoksyczności 5-FU, skierowanej przeciwko komórkom raka okrężnicy [83]. Ponadto wykazano synergizm w działaniu cytotoksycznym 5-FU, cisplatyny i przeciwciała monoklonalnego anti-FAS/APO1 w hodowli komórek raka pęcherza moczowego [84]. Okazało się jednakże, że obecność w komórkach ludzkiego raka okrężnicy prawidłowych kopii genu *TP53* zwiększa ekspresję FAS/APO1 i tym samym ułatwia apoptozę sterowaną poprzez szlak zewnętrzny [85]. W przypadku raka jelita grubego udział FAS/APO1-zależnej apoptozy w działaniu 5-FU został potwierdzony klinicznie u chorych z przerzutami tego nowotworu do wątroby [86]. Zwiększenie przez 5-FU podatności na apoptozę mediowaną przez FAS/APO1 zostało ponadto wykazane *in vitro* w przypadku płaskonabłonkowego raka jamy ustnej [87] oraz czerniaka [88]. Przedstawione wyniki badań sugerują możliwość wykorzystania 5-FU nie tylko jako radioczułacza (co od dawna jest wykorzystywane w leczeniu raka odbytnicy i płaskonabłonkowych raków głowy i szyi, jak również płaskonabłonkowego raka przełyku), ale również jako leku wspomagającego działanie różnych form immunoterapii nastawionych na indukowanie FAS/APO1-zależnej apoptozy.

Innym ciekawym aspektem działania 5-FU jest stymulowanie produkcji dużej ilości reaktywnych form tlenowych (RFT), takich jak anionorodnik ponadlenkowy, nadtlenuk wodoru i rodnik hydroksylowy. 5-FU, za pośrednictwem p53, stymuluje ekspresję genu *FDXR*, który koduje mitochondrialną reduktazę ferredoksynową (FR). FR jest odpowiedzialna za produkcję RFT. Nadekspresja FR hamuje wzrost komórek raka jelita grubego *in vitro*. Z kolei już częściowa inaktywacja *FDXR* wyraźnie zmniejsza natężenie p53-zależnej apoptozy indukowanej przez 5-FU [89]. W omawianej pracy dodatkowo wykazano, że ubikwinalny mitoQ, który jest bardzo silnym antyoksydantem inaktywującym RFT na poziomie mitochondriów, jest zdolny do całkowitego zablokowania

apoptozy indukowanej przez 5-FU. Przedstawione wyniki badań potwierdziły rezultaty wcześniejszych obserwacji, które wskazywały na istotny udział RFT w generowaniu proapoptotycznej aktywności białka p53 [90–94]. Wyniki badań Hwanga i wsp. [89] zostały częściowo potwierdzone przez Liu i Chen [95]. Co prawda cytowani autorzy nie stwierdzili zahamowania proliferacji komórek raka płuca, raka jelita grubego i raka piersi *in vitro* pod wpływem nadekspresji FR, ale udowodnili, że komórki raka płuca z nadekspresją tego białka stają się bardziej wrażliwe na apoptozę indukowaną przez 5-FU.

Znaczenie RFT jako mediatorów p53-zależnej apoptozy wydaje się być dobrze udokumentowane. Problem jest jednak daleki od pełnego rozwiązania, o czym świadczą wyniki badań opublikowane przez Adeyemo i wsp. [96]. Cytowani autorzy wykazali, że antyoksydanty mogą działać synergistycznie z 5-FU. W tym przypadku kluczową rolę pełni zwiększenie ekspresji proapoptotycznego białka BAX. Wyjaśnienie związków pomiędzy apoptozą generowaną przez 5-FU, produkcją RFT i działaniem antyoksydantów z pewnością wymaga dalszych badań.

## Podsumowanie

5-FU jest od wielu lat szeroko stosowany w leczeniu różnych nowotworów. Kluczowe procesy odpowiedzialne za wewnątrzkomórkowy metabolizm tego leku są dobrze poznane. Ponadto wiadomo, że 5-FU wykazuje pełnię działania cytotoksycznego w przypadku obecności w komórkach funkcjonalnego białka p53. Zjawisko to jest ściśle związane z opisanymi powyżej mechanizmami wykrywania uszkodzeń DNA i egzekwowania apoptozy, których punktem węzłowym jest właśnie aktywacja p53. Ze względu na złożoność omawianych procesów uzasadnione jest postawienie pytania o wpływ innych czynników molekularnych na efektywność cytotoksycznego działania 5-FU. Pomocna może tu być technologia mikromacierzy DNA, która pozwala na identyfikowanie zmian ekspresji tysięcy genów w ramach jednego eksperymentu. Podejście takie już zastosowano w przypadku komórek raka piersi poddanych działaniu 5-FU [97]. Wykazano, że 5-FU w największym stopniu stymuluje ekspresję genów kodujących acetylotransferazę sperminowo/spermidynową, aneksynę II, tymozynę-beta-10, chaperoninę-10 oraz MAT-8. Wymienione geny nie były dotychczas brane pod uwagę jako istotne w generowaniu cytotoksycznej odpowiedzi na 5-FU. Lepsze poznanie związku różnych czynników molekularnych zaangażowanych w wykrywanie uszkodzeń DNA i indukowanie apoptozy z cytotoksycznością 5-FU może zaowocować opracowaniem nowych strategii, terapeutycznych mających na celu zwiększenie efektywności działania tego leku.

## Piśmiennictwo

1. Sun W, Haller DG. Adjuvant therapy of colon cancer. *Semin Oncol* 2005; 32: 95-102.
2. Zhu AX, Willett CG. Combined modality treatment for rectal cancer. *Semin Oncol* 2005; 32: 103-12.
3. Dickson JL, Cunningham D. Systemic treatment of gastric cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 255-63.



4. Ilson DH. Oesophageal cancer: new developments in systemic therapy. *Cancer Treat Rev* 2003; 29: 525-32.
5. Jaiyesimi I. Chemotherapy regimens for breast cancer. W: *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach*. Pazdur R, Coia LR, Hoskins WJ, Wagman LD (red.). PRR, Inc., Melville, NY 2002; 213-7.
6. Okusaka T, Kosuge T. Systemic chemotherapy for pancreatic cancer. *Pancreas* 2004; 28: 301-4.
7. Fanucchi M, Khuri FR. Chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Semin Oncol* 2004; 31: 809-15.
8. Posner MR, Haddad RI, Wirth L, Norris CM, Goguen LA, Mahadevan A, Sullivan C, Tishler RB. Induction chemotherapy in locally advanced squamous cell cancer of the head and neck: evolution of the sequential treatment approach. *Semin Oncol* 2004; 31: 778-85.
9. Rich TA, Shepard RC, Mosley ST. Four decades of continuing innovation with fluorouracil: current and future approaches to fluorouracil chemoradiation therapy. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2214-32.
10. Hartmann JT, Bokemeyer C. Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 1999; 19: 1541-3.
11. Page R. Principles of chemotherapy. W: *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach*. Pazdur R, Coia LR, Hoskins WJ, Wagman LD (red.). PRR, Inc., Melville, NY 2002; 21-36.
12. Moertel CG. Treatment of the carcinoid tumor and the malignant carcinoid syndrome. *J Clin Oncol* 1983; 1: 727-40.
13. Goette DK. Topical chemotherapy with 5-fluorouracil. A review. *J Am Acad Dermatol* 1981; 4: 633-49.
14. Ensminger WD. Intrahepatic arterial infusion of chemotherapy: pharmacologic principles. *Semin Oncol* 2002; 29: 119-25.
15. Dizon DS, Kemeny NE. Intrahepatic arterial infusion of chemotherapy: clinical results. *Semin Oncol* 2002; 29: 126-35.
16. Barber FD, Mavligit G, Kurzrock R. Hepatic arterial infusion chemotherapy for metastatic colorectal cancer: a concise overview. *Cancer Treat Rev* 2004; 30: 425-36.
17. Pinedo HM, Peters GF. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol* 1988; 6: 1653-64.
18. Parker WB, Cheng YC. Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacol Ther* 1990; 48 (3): 381-95.
19. Schultz RM, Patel VF, Worzalla JF, Shih C. Role of thymidylate synthase in the antitumor activity of the multitargeted antifolate, LY231514. *Anticancer Res* 1999; 19: 437-43.
20. Schilsky RL. Antimetabolites. In: *The Chemotherapy Source Book*. Perry MC (red.). Williams & Wilkins, Baltimore 1992; 301-15.
21. Sampath D, Rao VA, Plunkett W. Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs. *Oncogene* 2003; 22: 9063-74.
22. Ingraham HA, Tseng BY, Goulian M. Nucleotide levels and incorporation of 5-fluorouracil and uracil into DNA of cells treated with 5-fluorodeoxyuridine. *Mol Pharmacol* 1982; 21: 211-6.
23. Mauro DJ, De Riel JK, Tallarida RJ, Sirover MA. Mechanisms of excision of 5-fluorouracil by uracil DNA glycosylase in normal human cells. *Mol Pharmacol* 1993; 43: 854-7.
24. Dolnick BJ, Wu XP. Effects of 5-fluorouracil on mRNA. *Adv Exp Med Biol* 1993; 339: 57-63; discussion 65.
25. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 330-8.
26. Kufe DW, Major PP. 5-Fluorouracil incorporation into human breast carcinoma RNA correlates with cytotoxicity. *J Biol Chem* 1981; 256: 9802-5.
27. Doong SL, Dolnick BJ. 5-Fluorouracil substitution alters pre-mRNA splicing in vitro. *J Biol Chem* 1988; 263: 4467-73.
28. Will CL, Dolnick BJ. 5-Fluorouracil inhibits dihydrofolate reductase precursor mRNA processing and/or nuclear mRNA stability in methotrexate-resistant KB cells. *J Biol Chem* 1989; 264: 21413-21.
29. Patton JR. Ribonucleoprotein particle assembly and modification of U2 small nuclear RNA containing 5-fluorouridine. *Biochemistry* 1993; 32: 8939-44.
30. Wu XP, Dolnick BJ. 5-Fluorouracil alters dihydrofolate reductase pre-mRNA splicing as determined by quantitative polymerase chain reaction. *Mol Pharmacol* 1993; 44: 22-9.
31. Ghoshal K, Jacob ST. Specific inhibition of pre-ribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma cells treated with 5-fluorouracil. *Cancer Res* 1994; 54: 632-6.
32. Ghoshal K, Jacob ST. An alternative molecular mechanism of action of 5-fluorouracil, a potent anticancer drug. *Biochem Pharmacol* 1997; 53: 1569-75.
33. Kunkel TA, Bebenek K. DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 497-529.
34. Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 22-33.
35. Lindahl T, Wood RD. Quality control by DNA repair. *Science* 1999; 286: 1897-1905.
36. Zhou B-BS, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000; 408: 433-439.
37. Walker GC. Understanding the complexity of an organism's responses to DNA damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2000; 65: 1-10.
38. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, i wsp. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995; 268: 1749-53.
39. Gatti RA, Becker-Catania S, Chun HH, i wsp. The pathogenesis of ataxia-telangiectasia. Learning from a Rosetta Stone. *Clin Rev Allergy Immunol* 2001; 20: 87-108.
40. Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY, Taya Y, Prives C, Abraham RT. A role of ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* 1999; 13: 152-7.
41. Bartek J, Lukas J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 2003; 3: 421-9.
42. Bakkenist CJ, Kastan MB. (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003; 421: 499-506.
43. Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J* 2003; 22: 5612-21.
44. Roos-Mattjus P, Vroman BT, Burtelow MA, Rauen M, Eapen AK, Karnitz LM. Genotoxin-induced Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) chromatin association is an early checkpoint signaling event. *J Biol Chem* 2002; 277: 43809-12.
45. Zou L, Cortez D, Elledge SJ. Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. *Genes Dev* 2002; 16: 198-208.
46. Bermudez VP, Lindsey-Boltz LA, Cesare AJ, Maniwa Y, Griffith JD, Hurwitz J, Sancar A. Loading of the human 9-1-1 checkpoint complex onto DNA by the checkpoint clamp loader hRad17-replication factor C complex in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 1633-8.
47. Zhao H, Piwnicka-Worms H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 4129-39.
48. Bartek J, Falck J, Lukas J. CHK2 kinase – a busy messenger. *Nat Rev Mol. Cell Biol* 2001; 2: 877-86.
49. Ahn JY, Li X, Davis HL, Canman CE. Phosphorylation of threonine 68 promotes oligomerization and autophosphorylation of the Chk2 protein kinase via the forkhead-associated domain. *Biol Chem* 2002; 277: 19389-95.
50. Groth A, Hansen K, Nigg EA, Sillje HHW, Lukas J, and Bartek J. Human tousel like kinases are targeted by an ATM and Chk1 dependent DNA damage checkpoint. *EMBO J* 2003; 22: 1676-87.
51. Xie S, Wu H, Wang Q, Kunicki J, Thomas RO, Hollingsworth RE, Cogswell J, Dai W. Genotoxic stress-induced activation of Plk3 is partly mediated by Chk2. *Cell Cycle* 2002; 1: 424-9.
52. Yang S, Kuo C, Bisi JE, Kim MK. PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 865-70.
53. Stevens C, Smith L, La Thangue NB. Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 401-9.
54. Sampath D, Shi Z, Plunkett W. Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by the Chk1-Cdc25A pathway during the S-phase checkpoint activated by fludarabine: dysregulation by 7-hydroxystaurosporine. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 680-8.
55. Liu Q, Guntuku S, Cui XS, i wsp. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G (2) /M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 2000; 14: 1448-59.
56. Hirao A, Cheung A, Duncan G. i wsp. Chk2 is a tumor suppressor that regulates apoptosis in both an ataxia telangiectasia muta-

- ted (ATM) -dependent and an ATM-independent manner. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 6521-32.
57. Kastan MB, Lim DS, Kim ST, Xu B, Canman C. Multiple signaling pathways involving ATM. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2000; 65: 521-6.
  58. Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 1996; 274: 1664-72.
  59. McGowan CH, Russell P. The DNA damage response: sensing and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 629-33.
  60. Pawlak WZ, Wawrocka-Pawlak M, Szczylik C. *Biologia molekularna czerniaka skóry. Współczesna Onkologia* 2003; 7: 548-555.
  61. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 1998; 282: 1497-501.
  62. Ljungman M. Dial 9-1-1 for p53: Mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia* 2000; 2: 208-25.
  63. Takai N, Hamanaka R, Yoshimatsu J, Miyakawa I. Polo-like kinases (Plks) and cancer. *Oncogene*. 2005 Jan 10; 24 (2): 287-91.
  64. Green D. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 2000; 102: 1-4.
  65. Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature Rev Cancer* 2002; 3: 420-30.
  66. Adams J, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-6.
  67. Hunt A, Evan G. Till death us do part. *Science* 2001; 293: 1784-5.
  68. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102: 33-42.
  69. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; 102: 43-53.
  70. Bunz F, Hwang PM, Torrance C, et al. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest* 1999; 104: 263-9.
  71. Boyer J, McLean EG, Aroori S, Wilson P, McCulla A, Carey PD, Longley DB, Johnston PG. Characterization of p53 wild-type and null isogenic colorectal cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil, oxaliplatin, and irinotecan. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2158-67.
  72. Matsushashi N, Saio M, Matsuo A, Sugiyama Y, Saji S. Apoptosis induced by 5-fluorouracil, cisplatin and paclitaxel are associated with p53 gene status in gastric cancer cell lines. *Int J Oncol* 2005; 26: 1563-7.
  73. Lee BJ, Chon KM, Kim YS, An WG, Roh HJ, Goh EK, Wang SG. Effects of cisplatin, 5-fluorouracil, and radiation on cell cycle regulation and apoptosis in the hypopharyngeal carcinoma cell line. *Chemotherapy* 2005; 51: 103-10.
  74. Luna-Perez P, Arriola EL, Cuadra Y, Alvarado I, Quintero A. p53 protein overexpression and response to induction chemoradiation therapy in patients with locally advanced rectal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 1998; 5: 203-8.
  75. Boku N, Chin K, Hosokawa K, i wsp. Biological markers as a predictor for response and prognosis of unresectable gastric cancer patients treated with 5-fluorouracil and cis-platinum. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1469-74.
  76. Wong CS, Tsao MS, Sharma V, Chapman WB, Pintilie M, Cummings BJ. Prognostic role of p53 protein expression in epidermoid carcinoma of the anal canal. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 45: 309-14.
  77. Cabelguenne A, Blons H, de Waziers I, i wsp. p53 alterations predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective series. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1465-73.
  78. Szumilo J, Chibowski D, Dąbrowski A. Assessment of the predictive value of clinical and histopathological factors as well as the immunorexpression of p53 and bcl-2 proteins in response to preoperative chemotherapy for esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 2000; 13: 191-7. Errata in: *Dis Esophagus* 2000; 13: 333.
  79. Backus HH, van Riel JM, van Groenigen CJ, Vos W, Dukers DF, Bloemena E, Wouters D, Pinedo HM, Peters GJ. Rb, mcl-1 and p53 expression correlate with clinical outcome in patients with liver metastases from colorectal cancer. *Ann Oncol* 2001; 12: 779-85.
  80. Rosati G, Chiacchio R, Reggiardo G, De Sanctis D, Manzione L. Thymidylate synthase expression, p53, bcl-2, Ki-67 and p27 in colorectal cancer: relationships with tumor recurrence and survival. *Tumour Biol* 2004; 25: 258-63.
  81. Andersson J, Larsson L, Klaar S, i wsp. Worse survival for TP53 (p53) -mutated breast cancer patients receiving adjuvant CMF. *Ann Oncol* 2005; 16: 743-8.
  82. Jiang S, Song MJ, Shin EC, Lee MO, Kim SJ, Park JH. Apoptosis in human hepatoma cell lines by chemotherapeutic drugs via Fas-dependent and Fas-independent pathways. *Hepatology* 1999; 29: 101-10.
  83. Tillman DM, Petak I, Houghton JA. A Fas-dependent component in 5-fluorouracil/leucovorin-induced cytotoxicity in colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 425-30.
  84. Mizutani Y, Wu XX, Yoshida O, Shirasaka T, Bonavida B. Chemoprevention of the T24 human bladder cancer line to Fas-mediated cytotoxicity and apoptosis by cisplatin and 5-fluorouracil. *Oncol Rep* 1999; 6: 979-82.
  85. Petak I, Tillman DM, Houghton JA. p53 dependence of Fas induction and acute apoptosis in response to 5-fluorouracil-leucovorin in human colon carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4432-41.
  86. Backus HH, Dukers DF, van Groenigen CJ, i wsp. 5-Fluorouracil induced Fas upregulation associated with apoptosis in liver metastases of colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2001; 12: 209-16.
  87. Iwase M, Watanabe H, Kondo G, Ohashi M, Nagumo M. Enhanced susceptibility of oral squamous cell carcinoma cell lines to FAS-mediated apoptosis by cisplatin and 5-fluorouracil. *Int J Cancer* 2003; 106: 619-25.
  88. Yang S, Haluska FG. Treatment of melanoma with 5-fluorouracil or dacarbazine in vitro sensitizes cells to antigen-specific CTL lysis through perforin/granzyme- and Fas-mediated pathways. *J Immunol* 2004; 172: 4599-608.
  89. Hwang PM, Bunz F, Yu J, Rago C, Chan TA, Murphy MP, Kelso GF, Smith RA, Kinzler KW, Vogelstein B. Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Nat Med* 2001; 7: 1111-7. Errata w: *Nat Med* 2001; 7: 1255.
  90. Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA, Finkel T. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93: 11848-52.
  91. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997; 389: 300-5.
  92. Lee JM. Inhibition of p53-dependent apoptosis by the KIT tyrosine kinase: regulation of mitochondrial permeability transition and reactive oxygen species generation. *Oncogene* 1998; 17: 1653-62.
  93. Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *EMBO J* 1999; 18: 6027-36.
  94. Liu G, Chen X. The ferredoxin reductase gene is regulated by the p53 family and sensitizes cells to oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene* 2002; 21: 7195-204.
  95. Adeyemo D, Imtiaz F, Toffa S, Lowdell M, Wickremasinghe RG, Winslet M. Antioxidants enhance the susceptibility of colon carcinoma cells to 5-fluorouracil by augmenting the induction of the bax protein. *Cancer Lett* 2001; 164: 77-84.
  96. Maxwell PJ, Longley DB, Latif T, i wsp. Identification of 5-fluorouracil-inducible target genes using cDNA microarray profiling. *Cancer Res* 2003; 63: 4602-6.

#### Adres do korespondencji

dr med. **Marlena Wawrocka-Pawlak**  
 Katedra i Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej  
 Akademia Medyczna  
 ul. Krakowskie Przedmieście 26/28  
 00-325 Warszawa  
 tel. +48 22 826 81 41  
 faks +48 22 826 45 85  
 e-mail: lena@amwaw.edu.pl